

PARTIAL TRANSLATION:

(19) European Patent Office

(11) Document N .: 338,971 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application No.: 89-730,103.2

(51) Int. Cl.⁴: A 61 K 9/50
A 61 K 47/00

(22) Filing Date of Application:

April 13, 1989

(30) Convention Priority Data:

April 16, 1988; FRG; No. 3,812,816

(43) Publication Date Of
Unexamined Document No
Which No Grant Has
Taken Place:

October 25, 1989; Patentblatt 89/43

(84) Treaty Nations Cited:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT,
LI, LU, NL, and SE

(71) Applicant:

Schering Aktiengesellschaft, Berlin
and Bergkamen
Müllerstrasse 170/178
Postfach 65 03 11
1000 Berlin 65, FRG

(72) Inventor:

Lawaczek, Rüdiger, Ph.D.
Beyschlagstrasse 8c
1000 Berlin 27, FRG

(54) Title of the Invention:

PROCESS FOR THE PRODUCTION OF LIPOSOMES AND/OR BIOLOGICAL CELLS
CONTAINING SUBSTANCES ENCLOSED WITHIN THEM AND THEIR USE

(57) Abstract:

For the incorporation into, addition to, and/or substitution of substances in liposomes or cells, sufficiently pressurized inert gases, which lead with increasing pressure to a decrease in the state of order of the lipids, are used in the gaseous and/or liquefied state. The loaded liposomes or cells are suitable as carriers of pharmaceutical agents.

-2- -



Office européen des brevets

A61K9/127P

Veröffentlichungsnummer:

0 338 971
A1

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

① Anmelde­nummer: 89730103.2

⑦ Int. Cl.: A 61 K 9/50
A 61 K 47/00

② Anmelde­tag: 13.04.89

③ Priorität: 16.04.88 DE 3812816

④ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
25.10.89 Patentblatt 89/43⑤ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE⑥ Anmelder: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT Berlin
und Bergkamen
Müllerstrasse 170/178 Postfach 65 03 11
D-1000 Berlin 65 (DE)⑦ Erfinder: Lewaczek, Rüdiger, Dr.
Beyschlagstrasse 8c
D-1000 Berlin 27 (DE)

⑧ Verfahren zur Herstellung von Liposomen und/oder biologischer Zellen, die Inhaltsstoffe eingeschlossen haben, sowie deren Verwendung.

⑨ Zur Inkorporation, Addition und/oder Substitution von Substanzen in Liposomen oder Zellen werden Inertgase, die mit steigendem Druck zu einer Verminderung der Lipidordnung führen, von hinreichend hohem Druck im gasförmigen und/oder verflüssigten Zustand verwendet. Die beladenen Liposomen oder Zellen sind als Pharmakaträger geeignet.

EP 0 338 971 A1

Beschreibung

Verfahren zur Herstellung von Liposomen und/oder biologischer Zellen, die Inhaltsstoffe eingeschlossen haben, sowie deren Verwendung

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen genannten Gegenstand, d.h. ein Verfahren zur Herstellung von Liposomen und/oder biologischer Zellen, die während der Herstellung extern zugesetzte Substanzen aufnehmen. In beiden Fällen erfolgt die Substanzaufnahme unter schonenden Bedingungen. Die beladenen Liposomen und/oder Zellen sind als zielgerichtete Pharmakaträger geeignet.

Liposomen sind aus Lipidmolekülen, vorzugsweise Phospholipiden, aufgebaut. Diese bilden im wässrigen Medium spontan Lipiddoppelschichten aus, die geschlossen und lamellenartig angeordnet sind. Eine oder mehrere Lamellen trennen das innere Kompartiment von der äußeren Lösung. Die polaren hydrophilen Kopfgruppen der Lipide (z.B. Ethanolamin beim Cephalin, Cholin beim Lecithin) zeigen zur Wasserphase hin, die unpolare hydrophoben Fettsäurereste sind ins Innere der Lipiddoppelschicht gerichtet. Die Doppelschichten sind zwei Moleküllagen oder 4 bis 5 nm dick. Man unterscheidet die Liposomen nach ihrer Größe und Anzahl der Lamellen und spricht von kleinen, unilamellaren (small unilamellar vesicles (SUV)) mit Radien bis zu 100 nm, großen unilamellaren (large unilamellar vesicles (LUV)) mit Radien größer als 100 nm sowie multilamellaren Liposomen (multilamellar vesicles (MLV)). In wässriger Phase lagern sich Phospholipide ohne Zutun zu multilamellaren Liposomen zusammen, bei denen zwiebelartig mehrere Lipiddoppelschichten durch Wasserschichten getrennt angeordnet sind.

Die Ausbildung lamellar angeordneter Lipiddoppelschichten ist eine Folge der Balance physikalischer Kräfte und sterischer Effekte. Die Lipiddoppelschicht formt auch den Bildungsblock der Plasmamembranen, die biologische Zellen umhüllen und bei denen als zweiter Baustein Proteine in die Lipidmatrix eingelagert sind.

Die physikalischen und physiologischen Eigenschaften von Liposomen sind durch deren Lipidzusammensetzung, Größe, Temperatur, pH, Art und Stärke des Puffers, Herstellungsbedingungen, Historie und Alter bestimmt. Die Verwendung von Liposomen, die mit Arzneimitteln beladen wurden, hat in der Diagnostik und Therapie großes Interesse gefunden. Liposomen eröffnen als zielgerichtete Träger von Pharmaka neue Diagnose- und Therapieformen (s. z.B. R. Lawaczek "Liposomen als zielgerichtete Pharmakaträger", Deutsche Apotheker Zeitung 127, 1771-1773 (1987), M.J. Ostro "Liposomes", Sci. Am. 256, 90-99 (1987)). Für pharmazeutische Zwecke sind die Permeabilität der Lipidmembran und die Stabilität der Liposomen von Interesse; physiologisch ist zudem die Fusogenität und die Kinetik der Zellaufnahme wichtig.

Aufgrund des breiten Interesses gibt es eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die sich mit der Physik, Chemie, Biologie, Herstellung und Verwendung von Liposomen befassen. Ein kürzlich erschie-

nener Übersichtsartikel mit pharmazeutischer Ausrichtung wurde von D. Lichtenberg und Y. Barenh 12 ("Liposomes: preparation, characterization, and preservation" in Methods of Bi chemical Analysis Vol. 33, 337-482 (1988)) publiziert. Die Verwendung von Zellen als Pharmakaträger wurde u.a. von C. Nicolau und Mitarbeitern beschrieben ("Resealed red blood cells as a new blood transfusion product", Biblithca haemat. 31, 82-91 (1985)).

Zur Herstellung uni- und oligolamellarer sowie beladener Liposomen wurden verschiedene Strategien entwickelt (referiert bei Lichtenberg & Barenholz), die schematisch klassifiziert werden können als 1. physikalische Zerschlagung durch Scherkräfte und 2. chemische Desintegration durch "Heffernmoleküle" der sich spontan bildenden multilamellaren Liposomen. Die Anwendung von Scherkräften ist beim Einschluß labiler Substanzen nicht geeignet. Heffernmoleküle stehen in Form von Detergentien oder organischer Lösungsmittelmoleküle zur Verfügung. Mit deren Hilfe werden Nicht-Doppelschicht-Aggregate der Lipidmoleküle (meist Mizellen) aus- 25 gebildet. Das Entfernen der Heffernmoleküle führt wieder zu den sich spontan bildenden liposomalen Doppelschichten und zur gleichzeitigen Aufnahme zugesetzter Substanzen. Die vollständige Entfernung der Detergenzmoleküle ist oft schwierig, zudem kann bei proteinhaltigen Einschlußmolekülen eine ungewünschte Denaturierung hinderlich sein. Die Aufnahme durch biologische Zellen kann durch hypo-osmolares Aufbrechen (Lyse) der Zellen mit nachfolgender Einstellung der Isotonie oder durch elektrisch induzierte Porenbildung erreicht werden. Dabei werden extern vorhandene Substanzen aufgenommen und während des Verschließens der Membran verkapselt. Eine schonende Lyse unter isotonen, detergent- und spannungsfreien Bedingungen ist bisher nicht bekannt. Es besteht demnach ein Bedarf an einem Herstellungsverfahren für 30 inhaltsstoffe-enthaltende Liposomen und/oder biologische Zellen, das die obengenannten Nachteile nicht aufweist. Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Es wurde nun gefunden, daß eine liposomale und/oder zelluläre Aufnahme von Substanzen, vorzugsweise Pharmaka für therapeutische und diagnostische Zwecke, überraschenderweise auch durch die Anwendung gasförmiger Heffernmoleküle erreicht werden kann. Dieses Verfahren weist nicht die Mängel der oben skizzierten Herstellungsverfahren auf. Bei diesem neuen Verfahren wird die wässrige Lipid- oder Zellsuspension, die neben den Lipiden oder Zellen die einzuschließende Substanz enthält, erfindungsgemäß mit einem Gas versetzt. Es kommen Gase mit "detergenzähnlichem Effekt" infrage, d.h. Gase, die im Gegensatz zum hydrostatischen Druck die Ordnung der Lipidmoleküle mit steigendem Druck erniedrigen und/oder zu einer Solubilisierung der Membran führen. Es wird bei dem jeweils angewendeten Druck die Einstellung des

thermodynamischen Gleichgewichts mit der wäßrigen Lipid- oder Zeilsuspension abgewartet. Die verwendeten Gase müssen chemisch hinsichtlich der Lipide und der Wasserphase inert sein und nicht wie Kohlendioxid oder Ammoniak eine Wechselwirkung mit Wasser eingehen. Vorzugsweise kommt die Verwendung leicht nachzubereiten, technisch zur Verfügung stehender Gase, die keinen toxischen Rückstand hinterlassen in einem Druckbereich bis zu 1000 bar, vorzugsweise bis zu 200 bar infrage. Ein Überschreiten der Siedekurve im p, T-Diagramm in den flüssigen Zustand kann vorteilhaft sein. Geeignete Gase sind vorzugsweise Lachgas (N_2O), Halothan, Argon, Xenon, Schwefelhexafluorid (SF_6), Alkane wie Methan, Ethan, Propan, Butan, Hexan, Heptan, Alkene wie Ethen, Propen, Buten, Hexen, Hepten. Bei Lachgas wird ein Druck bis 55 bar gewählt, wie er in technischen Druckflaschen zur Verfügung steht. Für die Temperatur steht der Bereich zwischen dem jeweiligen Gefrier- und Siedepunkt zur Verfügung, vorzugsweise 0° bis 37° C. Die genannten Gasmoleküle üben einen "detergenzähnlichen" Effekt aus und führen zu einer Öffnung und/oder Schließung der Lipiddoppelschicht und/oder Membran. Während der Entspannung bilden sich spontan neue Liposomen aus bzw. verschließen die Membranen wieder, so daß die zugesetzten Substanzen aufgenommen sind. Dieser Prozeß kann zyklisch wiederholt werden. Bei Liposomen ist eine Einengung der Liposomengröße über eine Druckentspannung auf Atmosphärendruck durch größenselektive Trennfilter möglich. Die Lipidzusammensetzung der Liposomen kann je nach therapeutischem und/oder diagnostischen Nutzen und nach dem Zielort optimiert werden. Bei den biologischen Zellen kommen neben den Zellen der Blutbahn wie Erythrocyten, Leukocyten, Lymphocyten und Thrombocyten vorzugsweise Zellen, die in Kultur gehalten werden, infrage.

Die Vorteile der Liposomenherstellung und Zellbeladung mit dem "Gasheller-Verfahren" liegen auf der Hand:

Das Verfahren ist technisch leicht zu realisieren und kostengünstig.

Die Gasmoleküle werden im Gegensatz zu den herkömmlichen Detergenzmolekülen leicht entfernt. Wegen des inerten Charakters und der nur in Spuren zurückbleibenden Mengen spielt die Toxizität der verwendeten Moleküle - wenn überhaupt - eine untergeordnete Rolle.

Vorteilhaft ist das Arbeiten bei physiologischen Temperaturen oder darunter.

Die Anwendung der Inertgase in dem genannten Druckbereich ist nicht schädigend für die meisten Substanzen oder Zellen.

Das Verfahren ist zur liposomalen und zellulären Addition, Inkorporation und/oder Substitution hydro- und lipophiler Substanzen geeignet.

Die beladenen Liposomen können oberflächenmodifiziert und als Ziel- oder organspezifische Pharmakaträger oder Pharmakaspeicher verwendet werden.

Beispiele

Beispiel 1: 20 mg Dimyristoyl-Lecithin werden in 1 ml Chloroform aufgenommen. Die Lösung wird in das Druckgefäß gegeben. Das Chloroform wird mit hochgereinigtem Stickstoff und nachfolgend unter Vakuum abgedampft. 2 ml Wasser enthaltend 1 mM Carboxyfluorescein (gereinigt und aus Ethanol umkristallisiert) 20 mM Tris HCl auf pH 8 eingestellt, werden eingefüllt. CO_2 und O_2 werden durch Spülen mit Lachgas ausgetrieben. Das Druckgefäß wird verschlossen und ein Lachgasdruck von 50 bar bei Raumtemperatur angelegt. Die Lösung wird 0,5 Stunden geschüttelt, danach wird langsam und isotherm auf Atmosphärendruck entspannt. Der Vorgang wird 5 mal wiederholt. Die Lösung wird aus dem Druckgefäß genommen und zur Entfernung des extern vorhandenen Carboxyfluoresceins über einen Anionenaustauscher gegeben. Die Liposomenfraktion enthält den eingeschlossenen Farbstoff und kann für Fluoreszenzstudien eingesetzt werden.

Beispiel 2: Wie Beispiel 1, anstelle von Dimyristoyl-Lecithin werden 200 mg einer 4 : 1 Mischung aus Egg-blecithin und Cholesterin genommen. Carboxyfluorescein wird durch 20 mM Gadolinium-DTPA als MR-Kontrastmittel ersetzt. Die erhaltenen Liposomen können für die MR-Diagnostik eingesetzt werden.

Beispiel 3: Herstellung von Erythrocyten oder Erythrocyten-Ghosts, die mit Carboxyfluorescein beladen sind, unter blutisotonen Bedingungen.

Frisches Rinderblut wird 3 mal in PBS Puffer pH 7,4 gewaschen und bis auf die Erythrocyten von anderen Bestandteilen befreit. Die dunkelrote, trübe Erythrocytensuspension wird mit PBS Puffer, der Carboxyfluorescein enthält, verdünnt, so daß die Konzentration des Carboxyfluoresceins 10^{-5} M beträgt. Die Lösung wird in eine Druckmeßzelle gegeben. Nach Spülen mit N_2O werden 50 bar N_2O bei 37° C angelegt, gerührt und die optische Dichte bei 675 nm verfolgt. Zwischen 400 und 600 min tritt Lyse der Zellen ein, deutlich sichtbar durch den typisch sigmoiden Abfall der optischen Dichte. Referenzmessungen unter Atmosphärendruck oder 50 bar hydrostatischem Druck zeigen bis zu 18 Stunden keine Lyse der Erythrocyten. Die Lösungen werden langsam auf Atmosphärendruck entspannt und unter dem Mikroskop in Durchsicht und Fluoreszenz untersucht. Die Erythrocyten zeigen vor und nach Lyse das typisch discoide Aussehen. Nicht-lysierte Zellen (Kontrollen) enthalten im Gegensatz zu den zwischenzeitlich lysierten kein Carboxyfluorescein. Die Zellfluoreszenz ist auch nach intensivem Waschen unverändert sichtbar. Es ist damit offensichtlich, daß die Erythrocyten den Farbstoff im lysierten Zustand unter isotonen Bedingungen aufgenommen haben und während der Entspannung wieder versiegelt wurden.

Beispiel 4: Wie Beispiel 3, nur werden

Schaferythrocyten anstelle der Rindererythrocyten in 2 mM KH_2PO_4 , 9 mM Na_2HPO_4 , 3 mM KCl, 137 mM NaCl pH 7.5 verwendet. Die Lyse tritt zwischen 55 bis 70 min ein. Die Ergebnisse sind mit denen aus Beispiel 3 vergleichbar.

Patentansprüche

1) Verfahren zur Herstellung inhaltsstoffenthaltender Liposomen und/oder biologischer Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß Liposomen oder biologische Zellen in wässrigem Medium mit Inertgasen, die mit steigendem Druck zu einer zunehmenden Abnahme der Lipidordnung führen, in gasförmigen oder flüssigen Zustand unter Zusatz der gewünschten Inhaltsstoffe unter Druck behandelt werden und anschließend eine Druckentspannung auf Atmosphärendruck vorgenommen wird.

2) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die von den Liposomen oder biologischen Zellen aufgenommenen Inhaltsstoffe Pharmaka sind.

3) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Inertgase Lachgas (N_2O), Halothan, Argon, Xenon, Schwefelhexafluorid (SF_6), Alkane wie Methan, Ethan, Pro-

pan, Butan, Hexan, Heptan, Alkene wie Ethen, Propen, Buten, Hexen, Hepten und/oder deren Mischungen verwendet werden.

4) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Druck bis zu 1000 bar, vorzugsweise bis zu 200 bar verwendet wird.

5) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Druckentspannung die Liposomensuspension durch größenselektive Filter gedrückt wird.

6) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Inhaltsstoffe inkorporiert, addiert und/oder substituiert werden.

7) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die biologischen Zellen der Blutbahn wie Erythrocyten, Leucocyten, Lymphocyten und Thrombocyten sind.

8) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die biologischen Zellen sind, die in Kultur gehalten werden und die pflanzlichen und/oder tierischen und/oder mikrobiellen Ursprungs sind.

9) Verwendung der nach Anspruch 1 hergestellten Liposomen und/oder biologischen Zellen als Vehikel für den Transport und/oder Speicherung von Pharmaka für diagnostische und/oder therapeutische Zwecke.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 73 0103

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X	EP-A-0 069 307 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.) " Insgesamt "	1-3,6,9	A 61 K 9/50 A 61 K 47/00
Y	---	4,5	
Y	WC-A-3 600 238 (THE LIPOSOME CO., INC.) " Seite 14, Zeile 1 - Seite 15, Zeile 4; Seite 19, Zeile 11 - Seite 20, Zeile 24; Beispiele 1,8 "	4,5	
A	EP-A-0 055 576 (THE PROCTER & GAMBLE CO.) " Seite 4, Zeilen 6-23; Seite 6, Zeile 13 - Seite 8, Zeile 27; Seite 10, Zeile 8 - Seite 12, Zeile 6 "	1-9	
A	FR-A-2 373 289 (KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH) " Seite 1, Zeile 1 - Seite 2, Zeile 18; Seite 5, Zeile 20 - Seite 7, Zeile 22 "	1-9	
A	US-A-4 327 710 (J.R. DELOACH) " Spalte 1, Zeile 10 - Spalte 2, Zeile 35; Anspruch 1 "	1-9	
			RECHERCHIERT: SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
			A 61 K

Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt

Recherchenamt	Abschließendes Datum	Prüfer
DEN HAAG	20-07-1989	MUELLNERS W.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		
<p>A: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie X: technischer Hintergrund O: nichttechnische Offenbarung P: Zusammenfassung</p>		
<p>T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>		

PARTIAL TRANSLATION:

(19) European Patent Office

(11) Document N .: 338,971 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application No.: 89-730,103.2

(51) Int. Cl.⁴: A 61 K 9/50
A 61 K 47/00

(22) Filing Date of Application:

April 13, 1989

(30) Convention Priority Data:

April 16, 1988; FRG; No. 3,812,816

(43) Publication Date Of
Unexamined Document No
Which No Grant Has
Taken Place:

October 25, 1989; Patentblatt 89/43

(84) Treaty Nations Cited:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT,
LI, LU, NL, and SE

(71) Applicant:

Schering Aktiengesellschaft, Berlin -
and Bergkamen
Müllerstrasse 170/178
Postfach 65 03 11
1000 Berlin 65, FRG

(72) Inventor:

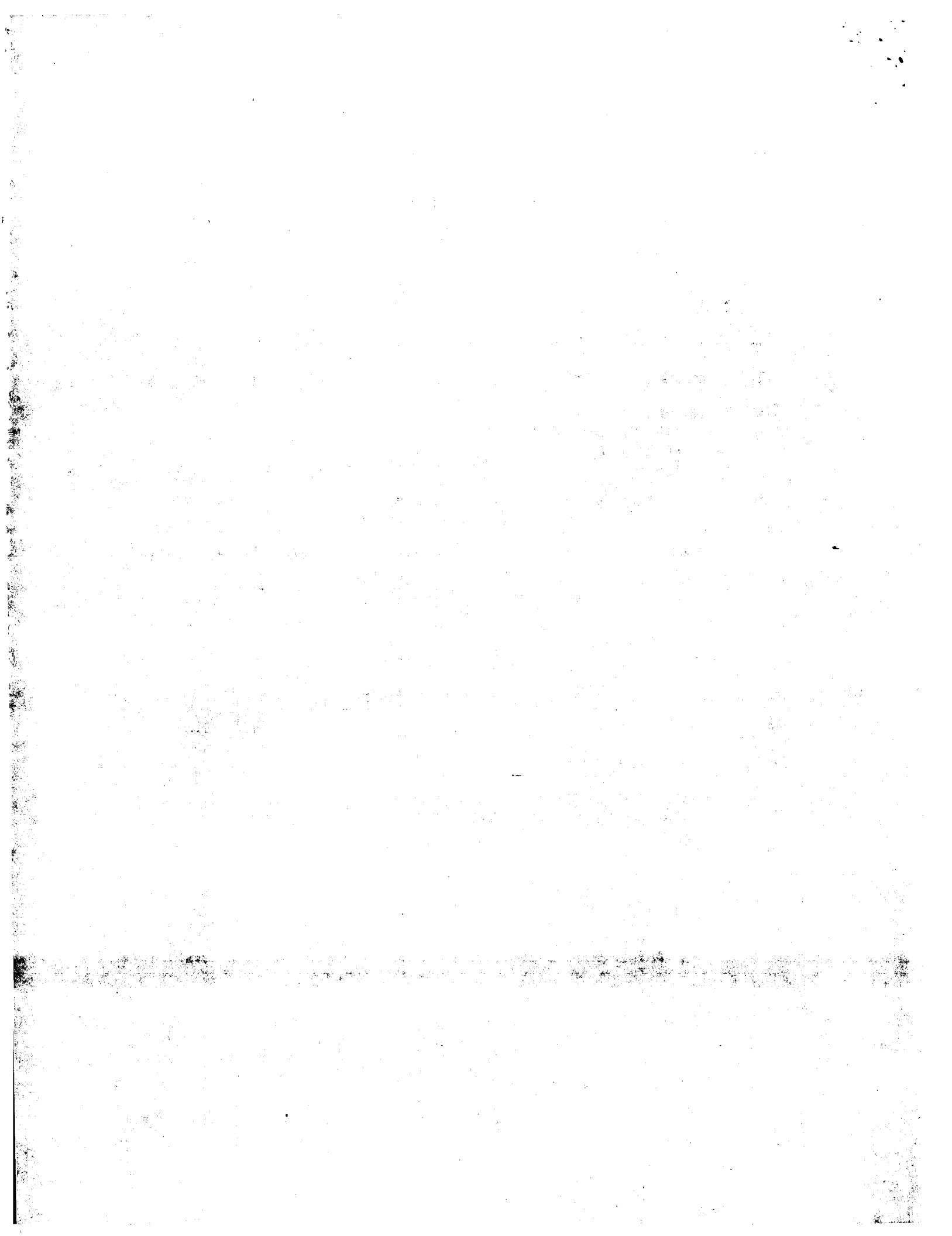
Lawaczek, Rüdiger, Ph.D.
Beyschlagstrasse 8c
1000 Berlin 27, FRG

(54) Title of the Invention:

PROCESS FOR THE PRODUCTION OF LIPOSOMES AND/OR BIOLOGICAL CELLS
CONTAINING SUBSTANCES ENCLOSED WITHIN THEM AND THEIR USE

(57) Abstract:

For the incorporation into, addition to, and/or substitution of substances in liposomes or cells, sufficiently pressurized inert gases, which lead with increasing pressure to a decrease in the state of order of the lipids, are used in the gaseous and/or liquefied state. The loaded liposomes or cells are suitable as carriers of pharmaceutical agents.



PARTIAL TRANSLATION:

(19) European Patent Office

(11) Document No.: 338,971 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application No.: 89-730,103.2

(51) Int. Cl.⁴: A 61 K 9/50
A 61 K 47/00

(22) Filing Date of Application:

April 13, 1989

(30) Convention Priority Data:

April 16, 1988; FRG; No. 3,812,816

(43) Publication Date Of
Unexamined Document No
Which No Grant Has
Taken Place:

October 25, 1989; Patentblatt 89/43

(84) Treaty Nations Cited:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT,
LI, LU, NL, and SE

(71) Applicant:

Schering Aktiengesellschaft, Berlin
and Bergkamen
Müllerstrasse 170/178
Postfach 65 03 11
1000 Berlin 65, FRG

(72) Inventor:

Lawaczek, Rüdiger, Ph.D.
Beyschlagstrasse 8c
1000 Berlin 27, FRG

(54) Title of the Invention:

PROCESS FOR THE PRODUCTION OF LIPOSOMES AND/OR BIOLOGICAL CELLS
CONTAINING SUBSTANCES ENCLOSED WITHIN THEM AND THEIR USE

(57) Abstract:

For the incorporation into, addition to, and/or substitution of substances in liposomes or cells, sufficiently pressurized inert gases, which lead with increasing pressure to a decrease in the state of order of the lipids, are used in the gaseous and/or liquefied state. The loaded liposomes or cells are suitable as carriers of pharmaceutical agents.

-2- -



Office européen des brevets

A61K9/127P

Veröffentlichungsnummer:

0 338 971

A1

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑫ Anmelde­nummer: 89730103.2

⑫ Int. Cl. 4: A 61 K 9/50
A 61 K 47/00

⑫ Anmelde­tag: 13.04.89

⑫ Priorität: 16.04.88 DE 3812816

⑫ Veröffentlichungs­tag der Anmeldung:
25.10.89 Patentblatt 89/43

⑫ Benannte Vertrags­staaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑫ Anmelder: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT Berlin
und Bergkamen
Müllerstrasse 170/178 Postfach 65 03 11
D-1000 Berlin 65 (DE)

⑫ Erfinder: Lawaczek, Rüdiger, Dr.
Beyerslagstrasse 8c
D-1000 Berlin 27 (DE)

DOC

⑫ Verfahren zur Herstellung von Liposomen und/oder biologischer Zellen, die Inhaltsstoffe eingeschlossen haben, sowie deren Verwendung.

⑫ Zur Inkorporation, Addition und/oder Substitution von Substanzen in Liposomen oder Zellen werden Inertgase, die mit steigendem Druck zu einer Verminderung der Lipidordnung führen, von hinreichend hohem Druck im gasförmigen und/oder verflüssigten Zustand verwendet. Die beladenen Liposomen oder Zellen sind als Pharmakaträger geeignet.

EP 0 338 971 A1

Beschreibung

Verfahren zur Herstellung von Liposomen und/oder biologischer Zellen, die Inhaltsstoffe eingeschlossen haben, sowie deren Verwendung

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen genannten Gegenstand, d.h. ein Verfahren zur Herstellung von Liposomen und/oder biologischer Zellen, die während der Herstellung extern zugesetzte Substanzen aufnehmen. In beiden Fällen erfolgt die Substanzaufnahme unter schonenden Bedingungen. Die beladenen Liposomen und/oder Zellen sind als zielgerichtete Pharmakaträger geeignet.

Liposomen sind aus Lipidmolekülen, vorzugsweise Phospholipiden, aufgebaut. Diese bilden im wässrigen Medium spontan Lipiddoppelschichten aus, die geschlossen und lamellenartig angeordnet sind. Eine oder mehrere Lamellen trennen das innere Kompartiment von der äußeren Lösung. Die polaren hydrophilen Kopfgruppen der Lipide (z.B. Ethanolamin beim Cephalin, Cholin beim Lecithin) zeigen zur Wasserphase hin, die unpolare hydrophobe Fettsäurereste sind ins Innere der Lipiddoppelschicht gerichtet. Die Doppelschichten sind zwei Moleküllagen oder 4 bis 5 nm dick. Man unterscheidet die Liposomen nach ihrer Größe und Anzahl der Lamellen und spricht von kleinen, unilamellaren (small unilamellar vesicles (SUV)) mit Radien bis zu 100 nm, großen unilamellaren (large unilamellar vesicles (LUV)) mit Radien größer als 100 nm sowie multilamellaren Liposomen (multilamellar vesicles (MLV)). In wässriger Phase lagern sich Phospholipide ohne Zutun zu multilamellaren Liposomen zusammen, bei denen zwiebelartig mehrere Lipiddoppelschichten durch Wasserschichten getrennt angeordnet sind.

Die Ausbildung lamellar angeordneter Lipiddoppelschichten ist eine Folge der Balance physikalischer Kräfte und sterischer Effekte. Die Lipiddoppelschicht formt auch den Bildungsblock der Plasmamembranen, die biologische Zellen umhüllen und bei denen als zweiter Baustein Proteine in die Lipidmatrix eingelagert sind.

Die physikalischen und physiologischen Eigenschaften von Liposomen sind durch deren Lipidzusammensetzung, Größe, Temperatur, pH, Art und Stärke des Puffers, Herstellungsbedingungen, Historie und Alter bestimmt. Die Verwendung von Liposomen, die mit Arzneimitteln beladen wurden, hat in der Diagnostik und Therapie großes Interesse gefunden. Liposomen eröffnen als zielgerichtete Träger von Pharmaka neue Diagnose- und Therapieformen (s. z.B. R. Lawaczeck "Liposomen als zielgerichtete Pharmakaträger", Deutsche Apotheker Zeitung 127, 1771-1773 (1987), M.J. Ostro "Liposomes", Sci. Am. 256, 90-99(1987)). Für pharmazeutische Zwecke sind die Permeabilität der Lipidmembran und die Stabilität der Liposomen von Interesse: physiologisch ist zudem die Fusogenität und die Kinetik der Zellaufnahme wichtig.

Aufgrund des breiten Interesses gibt es eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die sich mit der Physik, Chemie, Biologie, Herstellung und Verwendung von Liposomen befassen. Ein kürzlich erschie-

nener Übersichtsartikel mit pharmazeutischer Ausrichtung wurde von D. Lichtenberg und Y. Barenholz ("Liposomes: preparation, characterization, and preservation" in Methods of Biochemical Analysis Vol. 33, 337-462 (1988)) publiziert. Die Verwendung von Zellen als Pharmakaträger wurde u.a. von C. Nicolau und Mitarbeitern beschrieben ("Resealed red blood cells as a new blood transfusion product", Biblithca haemat. 51, 82-91 (1985)).

Zur Herstellung uni- und oligolamellarer sowie beladener Liposomen wurden verschiedene Strategien entwickelt (referiert bei Lichtenberg & Barenholz), die schematisch klassifiziert werden können als 1. physikalische Zerschlagung durch Scherkräfte und 2. chemische Desintegration durch "Heftmoleküle" der sich spontan bildenden multilamellaren Liposomen. Die Anwendung von Scherkräften ist beim Einschluß labiler Substanzen nicht geeignet. Heftmoleküle stehen in Form von Detergentien oder organischer Lösungsmittelmoleküle zur Verfügung. Mit deren Hilfe werden Nicht-Doppelschicht-Aggregate der Lipidmoleküle (meist Mizellen) ausgebildet. Das Entfernen der Heftmoleküle führt wieder zu den sich spontan bildenden liposomalen Doppelschichten und zur gleichzeitigen Aufnahme zugesetzter Substanzen. Die vollständige Entfernung der Detergenzmoleküle ist oft schwierig, zudem kann bei proteinhaltigen Einschlußmolekülen eine ungewünschte Denaturierung hinderlich sein. Die Aufnahme durch biologische Zellen kann durch hypo-osmolares Aufbrechen (Lyse) der Zellen mit nachfolgender Einstellung der Isotonie oder durch elektrisch induzierte Porenbildung erreicht werden. Dabei werden extern vorhandene Substanzen aufgenommen und während des Verschließens der Membran verkapselt. Eine schonende Lyse unter isotonen, detergenten- und spannungsfreien Bedingungen ist bisher nicht bekannt. Es besteht demnach ein Bedarf an einem Herstellungsverfahren für inhaltsstoffe-enthaltende Liposomen und/oder biologische Zellen, das die obengenannten Nachteile nicht aufweist. Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Es wurde nun gefunden, daß eine liposomale und/oder zelluläre Aufnahme von Substanzen, vorzugsweise Pharmaka für therapeutische und diagnostische Zwecke, überraschenderweise auch durch die Anwendung gasförmiger Heftmoleküle erreicht werden kann. Dieses Verfahren weist nicht die Mängel der oben skizzierten Herstellungsverfahren auf. Bei diesem neuen Verfahren wird die wässrige Lipid- oder Zellsuspension, die neben den Lipiden oder Zellen die einzuschließende Substanz enthält, erfindungsgemäß mit einem Gas versetzt. Es kommen Gase mit "detergenzähnlichem Effekt" infrage, d.h. Gase, die im Gegensatz zum hydrostatischen Druck die Ordnung der Lipidmoleküle mit steigendem Druck erniedrigen und/oder zu einer Solubilisierung der Membran führen. Es wird bei dem jeweils angewendeten Druck die Einstellung des

thermodynamischen Gleichgewichts mit der wäßrigen Lipid- oder Zeilsuspension abgewartet. Die verwendeten Gase müssen chemisch hinsichtlich der Lipide und der Wasserphase inert sein und nicht wie Kohlendioxid oder Ammoniak eine Wechselwirkung mit Wasser eingehen. Vorzugsweise kommt die Verwendung leicht nachabbarer, technisch zur Verfügung stehender Gase, die keinen toxischen Rückstand hinterlassen in einem Druckbereich bis zu 1000 bar, vorzugsweise bis zu 200 bar infrage. Ein Überschreiten der Siedekurve im p, T-Diagramm in den flüssigen Zustand kann vorteilhaft sein. Geeignete Gase sind vorzugsweise Lachgas (N_2O), Halogon, Argon, Xenon, Schwefelhexafluorid (SF_6), Alkane wie Methan, Ethan, Propan, Butan, Hexan, Heptan, Alkene wie Ethen, Propen, Buten, Hexen, Hepten. Bei Lachgas wird ein Druck bis 55 bar gewählt, wie er in technischen Druckflaschen zur Verfügung steht. Für die Temperatur steht der Bereich zwischen dem jeweiligen Gefrier- und Siedepunkt zur Verfügung, vorzugsweise 0° bis 37° C. Die genannten Gasmoleküle üben einen "detergenzähnlichen" Effekt aus und führen zu einer Öffnung und/oder Solubilisierung der Lipiddoppelschicht und/oder Membran. Während der Entspannungsphase bilden sich spontan neue Liposomen aus bzw. verschließen die Membranen wieder, so daß die zugesetzten Substanzen aufgenommen sind. Dieser Prozeß kann zyklisch wiederholt werden. Bei Liposomen ist eine Einengung der Liposomengröße über eine Druckentspannung auf Atmosphärendruck durch größenselektive Trennfilter möglich. Die Lipidzusammensetzung der Liposomen kann je nach therapeutischem und/oder diagnostischen Nutzen und nach dem Zielort optimiert werden. Bei den biologischen Zellen kommen neben den Zellen der Blutbahn wie Erythrocyten, Leukocyten, Lymphocyten und Thrombocyten vorzugsweise Zellen, die in Kultur gehalten werden, infrage.

Die Vorteile der Liposomenherstellung und Zellbeladung mit dem "Gashelmer-Verfahren" liegen auf der Hand:

Das Verfahren ist technisch leicht zu realisieren und kostengünstig.

Die Gasmoleküle werden im Gegensatz zu den herkömmlichen Detergenzmolekülen leicht entfernt. Wegen des inerten Charakters und der nur in Spuren zurückbleibenden Mengen spielt die Toxizität der verwendeten Moleküle - wenn überhaupt - eine untergeordnete Rolle.

Vorteilhaft ist das Arbeiten bei physiologischen Temperaturen oder darunter.

Die Anwendung der Inertgase in dem genannten Druckbereich ist nicht schädigend für die meisten Substanzen oder Zellen.

Das Verfahren ist zur liposomalen und zellulären Addition, Inkorporation und/oder Substitution hydro- und lipophiler Substanzen geeignet.

Die beladenen Liposomen können oberflächenmodifiziert und als Zell- oder organspezifische Pharmakaträger oder Pharmakaspeicher verwendet werden.

Beispiele

Beispiel 1: 20 mg Dimyristoyl-Lecithin werden in 1 ml Chloroform aufgenommen. Die Lösung wird in das Druckgefäß gegeben. Das Chloroform wird mit nachgereinigtem Stickstoff und nachfolgend unter Vakuum abgedampft. 2 ml Wasser enthaltend 1 mM Carboxyfluorescein (gereinigt und aus Ethanol umkristallisiert) 20 mM Tris HCl auf pH 8 eingestellt, werden eingefüllt. CO_2 und O_2 werden durch Spülen mit Lachgas ausgetrieben. Das Druckgefäß wird verschlossen und ein Lachgasdruck von 50 bar bei Raumtemperatur angelegt. Die Lösung wird 0,5 Stunden geschüttelt, danach wird langsam und isotherm auf Atmosphärendruck entspannt. Der Vorgang wird 5 mal wiederholt. Die Lösung wird aus dem Druckgefäß genommen und zur Entfernung des extern vorhandenen Carboxyfluoresceins über einen Anionenaustauscher gegeben. Die Liposomenfraktion enthält den eingeschlossenen Farbstoff und kann für Fluoreszenzstudien eingesetzt werden.

Beispiel 2: wie Beispiel 1, anstelle von Dimyristoyl-Lecithin werden 200 mg einer 4 : 1 Mischung aus Egg-blecithin und Cholesterin genommen. Carboxyfluorescein wird durch 20 mM Gadolinium-DTPA als MR-Kontrastmittel ersetzt. Die erhaltenen Liposomen können in der MR-Diagnostik eingesetzt werden.

Beispiel 3: Herstellung von Erythrocyten oder Erythrocyten-Ghosts, die mit Carboxyfluorescein beladen sind, unter blutisotonen Bedingungen.

Frisches Rinderblut wird 3 mal in PSS Puffer pH 7,4 gewaschen und bis auf die Erythrocyten von anderen Bestandteilen befreit. Die dunkelrote, trübe Erythrocytensuspension wird mit PSS Puffer, der Carboxyfluorescein enthält, verdünnt, so daß die Konzentration des Carboxyfluoresceins 10^{-5} M beträgt. Die Lösung wird in eine Druckmeßzelle gegeben. Nach Spülen mit N_2O werden 50 bar N_2O bei 37° C angelegt, gerührt und die optische Dichte bei 675 nm verfolgt. Zwischen 400 und 600 min tritt Lyse der Zellen ein, deutlich sichtbar durch den typisch sigmoiden Abfall der optischen Dichte. Referenzmessungen unter Atmosphärendruck oder 50 bar hydrostatischem Druck zeigen bis zu 18 Stunden keine Lyse der Erythrocyten. Die Lösungen werden langsam auf Atmosphärendruck entspannt und unter dem Mikroskop in Durchsicht und Fluoreszenz untersucht. Die Erythrocyten zeigen vor und nach Lyse das typisch discoidale Aussehen. Nicht-lysierte Zellen (Kontrollen) enthalten im Gegensatz zu den zwischenzeitlich lysierten kein Carboxyfluorescein. Die Zellfluoreszenz ist auch nach extensivem Waschen unverändert sichtbar. Es ist damit offensichtlich, daß die Erythrocyten den Farbstoff im lysierten Zustand unter isotonen Bedingungen aufgenommen haben und während der Entspannung wieder versiegelt wurden.

Beispiel 4: Wie Beispiel 3, nur werden

Schaferythrocyten anstelle der Rindererythrocyten in 2 mM KH_2PO_4 , 9 mM Na_2HPO_4 , 3 mM KCl , 137 mM NaCl pH 7.5 verwendet. Die Lyse tritt zwischen 55 bis 70 min ein. Die Ergebnisse sind mit denen aus Beispiel 3 vergleichbar.

Patentansprüche

1) Verfahren zur Herstellung inhaltsstoffenthaltender Liposomen und/oder biologischer Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß Liposomen oder biologische Zellen in wäßrigem Medium mit Inertgasen, die mit steigendem Druck zu einer zunehmenden Abnahme der Lipidordnung führen, im gasförmigen oder flüssigen Zustand unter Zusatz der gewünschten Inhaltsstoffe unter Druck behandelt werden und anschließend eine Druckentspannung auf Atmosphärendruck vorgenommen wird.

2) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die von den Liposomen oder biologischen Zellen aufgenommenen Inhaltsstoffe Pharmaka sind.

3) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Inertgase Lachgas (N_2O), Halothan, Argon, Xenon, Schwefelhexafluorid (SF_6), Alkane wie Methan, Ethan, Pro-

pan, Butan, Hexan, Heptan, Alkene wie Ethen, Propen, Buten, Hexen, Hepten und/oder deren Mischungen verwendet werden.

4) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Druck bis zu 1000 bar, vorzugsweise bis zu 200 bar verwendet wird.

5) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Druckentspannung die Liposomensuspension durch größenselektive Filter gedrückt wird.

6) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Inhaltsstoffe inkorporiert, addiert und/oder substituiert werden.

7) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die biologischen Zellen Zellen der Blutbahn wie Erythrocyten, Leucocyten, Lymphocyten und Thrombocyten sind.

8) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die biologischen Zellen Zellen sind, die in Kultur gehalten werden und die pflanzlichen und/oder tierischen und/oder mikrobiellen Ursprungs sind.

9) Verwendung der nach Anspruch 1 hergestellten Liposomen und/oder biologischen Zellen als Vehikel für den Transport und/oder Speicherung von Pharmaka für diagnostische und/oder therapeutische Zwecke.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung:

EP 89 73 0103

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Art. 61.4)
X	EP-A-0 069 307 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.) " Insgesamt "	1-3, 6, 9	A 61 K 9/50 A 61 K 47/00
Y	---	4, 5	
Y	WO-A-3 600 238 (THE LIPOSOME CO., INC.) " Seite 14, Zeile 1 - Seite 15, Zeile 4; Seite 19, Zeile 11 - Seite 20, Zeile 24; Beispiele 1, 8 "	4, 5	
A	EP-A-0 055 576 (THE PROCTER & GAMBLE CO.) " Seite 4, Zeilen 6-23; Seite 6, Zeile 13 - Seite 8, Zeile 27; Seite 10, Zeile 8 - Seite 12, Zeile 6 "	1-9	
A	FR-A-2 373 289 (KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH) " Seite 1, Zeile 1 - Seite 2, Zeile 18; Seite 5, Zeile 20 - Seite 7, Zeile 22 "	1-9	
A	US-A-4 327 710 (J.R. DELOACH) " Spalte 1, Zeile 10 - Spalte 2, Zeile 35; Anspruch 1 "	1-9	

RECHERCHIERTE
SACHGEBIETE (Art. 61.4)

A 61 K

Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt

Kategorie	Datum der Recherche	Prüfer
DEN HAAG	20-07-1989	MUELLNERS W.
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technischer Hintergrund D: analytische Offenbarung P: Prioritätsliteratur</p> <p>T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument A: Mitglieder der gleichen Patentfamilie, überwachendes Dokument</p>		
